

Alfa-talassémia deletional e fenótipo hematológico: parâmetros associados às diferentes deleções na casuística de 2015 a 2019

Deletional alpha-thalassemia and hematological phenotype: indicative parameters of the different deletions in the series from 2015 to 2019

Gisela Gaspar¹, Rita de Mira Ramalho², Filomena Seuanes¹, Carla Feliciano¹, Guida Duarte¹, Sandra Copeto¹, Alcina Costa¹, João Xavier Santos^{1,3}, Armandina Miranda¹

armandina.miranda@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Serviço de Patologia Clínica, Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, Lisboa, Portugal

(3) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

Resumo

As talassémias são caracterizadas por um desequilíbrio quantitativo nas cadeias globínicas devido à redução ou supressão da síntese de uma das cadeias. Foram avaliados retrospectivamente os resultados de 496 casos suspeitos de α -talassémia deletional e correlacionados com os dados hematológicos. A pesquisa de deleções causadoras de α -talassémia foi efetuada por Gap e Multiplex Gap-PCR. A maioria dos casos (n=190) apresentou um genótipo normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), seguido de heterozigotia ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (n=148) e homozigotia ($-\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$) (n=141) para a deleção de 3,7kb. Detetaram-se ainda 5 casos de heterozigotia para a deleção de 4,2Kb ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$), 4 de dupla heterozigotia ($\alpha^{3.7}/\alpha^{4.2}$), 7 de heterozigotia α^0 ($--^{SEA}/\alpha\alpha$), e 1 de Hb H ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). Os resultados evidenciaram que o VGM e o HGM são excelentes índices hematológicos de rastreio e seleção dos testes moleculares, sendo o seu valor tanto mais baixo quanto maior o número de genes deletacionados. Os resultados obtidos são ainda concordantes com o descrito na literatura e reforçam que o valor de *cut-off* de 25 pg (HGM), tem sensibilidade adequada para inferir da presença de uma deleção α^0 -talassémia. A deteção da deleção α^0 assume particular importância na prevenção da ocorrência de Hb Bart's na descendência de um casal de portadores. O diagnóstico de α -talassémia é efetuado por métodos moleculares, no entanto os índices hematológicos são importantes marcadores preditivos do número de genes alfa deletacionados e da relação fenótipo/genótipo.

Abstract

Thalassemias are characterized by a quantitative imbalance of the globin chains due to the reduction or suppression of the synthesis of one of the globin chains. In the present study, we evaluated retrospectively 496 cases suspected of deletional α -thalassemia and we correlated them with the hematological data available. We searched for α -thalassemia deletions by performing Gap and Multiplex Gap-PCR. Most patients (n=190) had a normal genotype ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), followed by heterozygosity ($-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$) (n=148) and homozygosity ($-\alpha^{3.7}/\alpha^{3.7}$) (n=141) for the 3.7kb deletion. We also detected 5 cases of heterozygosity for the 4.2Kb deletion ($-\alpha^{4.2}/\alpha\alpha$), 4 of double heterozygosity ($\alpha^{3.7}/\alpha^{4.2}$), 7 heterozygosity α^0 ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) and 1 of Hb H ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). The results showed that the MCV and the MCH are excellent hematological indices for screening and selection of patients for molecular testing (their value being the lower the greater the number of deleted genes). Our results are in line with those described in the literature and reinforce that the cut-off value of 25 pg (HGM) is sensitive enough to infer the presence of an α^0 -thalassemia deletion. The detection of the α^0 deletion is very important in preventing the occurrence of Hb Bart's in the offspring of a carrier couple. Genetic testing makes the diagnosis of α -thalassemia, however hematological indices are relevant predictive markers of the number of deleted alpha genes and the phenotype/genotype correlation.

7 heterozygosity α^0 ($--^{SEA}/\alpha\alpha$) and 1 of Hb H ($--^{SEA}/-\alpha^{3.7}$). The results showed that the MCV and the MCH are excellent hematological indices for screening and selection of patients for molecular testing (their value being the lower the greater the number of deleted genes). Our results are in line with those described in the literature and reinforce that the cut-off value of 25 pg (HGM) is sensitive enough to infer the presence of an α^0 -thalassemia deletion. The detection of the α^0 deletion is very important in preventing the occurrence of Hb Bart's in the offspring of a carrier couple. Genetic testing makes the diagnosis of α -thalassemia, however hematological indices are relevant predictive markers of the number of deleted alpha genes and the phenotype/genotype correlation.

Introdução

A hemoglobina (Hb) presente nos eritrócitos é constituída por quatro cadeias de globina, duas cadeias do tipo α e duas do tipo não- α . A Hb A, predominante nos adultos, é composta por duas cadeias α e duas cadeias β , que são sintetizadas de forma equilibrada e sob o controlo de genes localizados nos cromossomas 16 e 11, respetivamente. As talassémias são caracterizadas por um desequilíbrio quantitativo devido à redução ou supressão da síntese de uma das cadeias globínicas.

A maioria das α -talassémias são causadas por deleções, (α -talassémias deletionais) embora também possam ocorrer mutações pontuais (α -talassémias não-deletionais), sendo a sua base molecular muito heterogénea.

A α -talassémia é uma das doenças genéticas mais comuns a nível mundial. A sua distribuição geográfica é variável,



com maior prevalência em algumas regiões da China e do Sudeste asiático, mas também no continente africano, Mediterrâneo e no Médio Oriente.

O défice de cadeias α conduz à destruição de eritrócitos em circulação e conseqüentemente à diminuição da quantidade de hemoglobina por célula, originando microcitose e hipocromia (1). Os testes hematológicos de rastreio de α -talassémia são o hemograma com VGM (Volume Globular Médio) <80 fL e/ou HGM (Hemoglobina Globular Média) <27 pg e Hb A2 normal ($<3,5\%$) (2,3).

Existem quatro graus de gravidade consoante o número de genes α -globina afetados (figura 1).

A deleção de um gene α -globina, heterozigotia para α^+ -talassémia ($-\alpha/\alpha\alpha$), resulta num portador silencioso. A deleção de dois genes α -globina no mesmo cromossoma, heterozigotia para α^0 -talassémia ($--/\alpha$), ou nos cromossomas homólogos, homozigotia para α^+ ($-\alpha/-\alpha$), pode resultar numa anemia microcítica hipocrômica, ligeira a moderada. Por outro lado, a deleção de três genes α ($--/-\alpha$) resulta numa talassémia intermédia, doença de Hb H. A deleção dos quatro genes α resulta em hipoxia grave e anemia durante o desenvolvimento uterino (Hb Bart's e *Hydrops fetalis*; $--/--$), levando à morte fetal ou neonatal (4).

A deleção α^+ mais comum é a de 3.7Kb ($-\alpha^{3,7}$) que representa mais de 80% das deleções alfa talassémicas, sendo frequentemente encontrada no continente africano (10-30%) (4).

As deleções α^0 são mais comuns no Sudeste Asiático ($--SEA$, $--FIL$ e $--THAI$) e no Mediterrâneo (as duas mais comuns são $--MED$ e $-\alpha^{20,5}$) (5).

_Objetivo

Este estudo teve como objetivo correlacionar as diferentes alterações genéticas de α -talassémia deletional com o correspondente fenótipo hematológico, com base na casuística de 2015 a 2019.

_Materiais e métodos

Foram avaliados retrospectivamente os resultados de 496 casos de estudo de α -talassémia deletional, no Departamento de Promoção da Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis (DPS), do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Todos os casos foram anonimizados previamente à sua análise.

A pesquisa das deleções α -talassémia, 3,7 kb ($-\alpha^{3,7}$), 4,2 kb ($-\alpha^{4,2}$), $--SEA$, $--MED$, $-\alpha^{20,5}$, $--FIL$ e $--THAI$, foi efetuada por Gap-PCR e Multiplex Gap-PCR.

Figura 1: Relação fenótipo-genótipo na α -talassémia deletional.

Fenótipo	$\alpha 2$	$\alpha 1$	Genótipo
Normal			$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Alfa-talassémia silenciosa, α^+			$-\alpha/\alpha\alpha$
Alfa-talassémia homozigótico para α^+			$-\alpha/-\alpha$
Alfa-talassémia heterozigótico para α^0			$--/\alpha\alpha$
Hemoglobina H			$--/-\alpha$
Hb Bart's, <i>hydrops fetalis</i>			$--/--$



Seguindo o procedimento instituído, previamente ao estudo molecular, foi efetuada a avaliação hematológica (eritrograma, focagem isoelétrica da Hb e a quantificação da Hb A₂ e Hb F por cromatografia líquida de alta eficiência de troca iónica).

Não foram incluídos neste estudo os portadores de α -talassémia deletional com outra hemoglobinopatia adicional.

A análise estatística dos resultados foi efetuada através do cálculo da média, desvio padrão, mediana e teste T de *Student*, com um nível de significância de 0,05.

Resultados e discussão

Do total de 496 casos avaliados, de 2015 a 2019, 92 correspondiam a crianças com idade ≤ 2 anos, 58 com idade >2 anos ≤ 6 anos e 60 entre os 6 anos e 12 anos. No grupo etário >12 anos, 117 eram do género masculino e 169 do género feminino, num total de 286 casos.

As amostras foram analisadas para a pesquisa das deleções α^+ mais comuns na população portuguesa ($-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{4,2}$) e deleções α^0 ($--SEA$, $--MED$, $-\alpha^{20,5}$, $--FIL$ e $--THAI$) (1,2,5) (tabela 1).

Os genótipos mais frequentes foram o normal ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), a heterozigotia para 3,7kb ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$) e a homozigotia para 3,7kb ($-\alpha^{3,7}/\alpha^{3,7}$). Foram detetados 5 casos de heterozigotia para 4,2Kb ($-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$), 4 de dupla heterozigotia

($\alpha^{3,7}/\alpha^{4,2}$), 7 de heterozigotia α^0 ($--SEA/\alpha\alpha$), e 1 caso de Hb H (genótipo $--SEA/-\alpha^{3,7}$).

A média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos para cada grupo etário e genótipo encontram-se descritas na tabela 2.

Para os valores de Hb e VGM não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/\alpha\alpha$ ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$; $-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$). Relativamente ao HGM verificou-se significância estatística apenas no grupo etário dos $>2-6$ anos.

Na Hb verificou-se uma tendência decrescente com diferença estatisticamente significativa entre os genótipos $-\alpha^+/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$; $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$) e entre os genótipos $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$, nos grupos etários $>2-6$ anos, $>6-12$ anos e >12 anos F.

No VGM, observou-se um decréscimo proporcional ao número de genes deletados, em todos os grupos etários, verificando-se diferença estatisticamente significativa entre os genótipos $-\alpha^+/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ nos maiores de 6 anos, e entre $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ em todos os grupos etários.

O HGM também apresentou uma tendência decrescente proporcional ao número de genes deletados (figura 2), observando-se significância estatística em todas as faixas etárias entre os genótipos $-\alpha^+/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ e $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ (tabela 2).

Tabela 1: Distribuição dos genótipos α -talassémia deletional e sua frequência por idade e género, na casuística de 2015 a 2019 (n=496).

	Genótipos														
	Total	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$		$-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$		$-\alpha^{4,2}/\alpha\alpha$		$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$		$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$		$--SEA/\alpha\alpha$		$--SEA/-\alpha^{3,7}$	
	n	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
≤ 2 anos	92	42	46	25	27	0		25	27	0		0		0	
$>2-6$ anos	58	20	34	25	43	0		13	22	0		0		0	
$>6-12$ anos	60	19	32	23	38	0		16	27	0		2		0	
>12 anos (máx.=80 anos)	286	109	38	75	26	5	2	87	30	4	1	5	2	1	0,3
Feminino	169	69	41	41	24	2	1	53	31	0		4	2	0	
Masculino	117	40	34	34	29	3	3	34	29	4	3	1	0,9	1	1



Tabela 2: Médias (\bar{x}) dos valores de Hb (hemoglobina), VGM (volume globular médio) e HGM (hemoglobina globular média), nos diferentes grupos etários, de acordo com os genótipos α -talassémia deletional e avaliação da significância estatística.

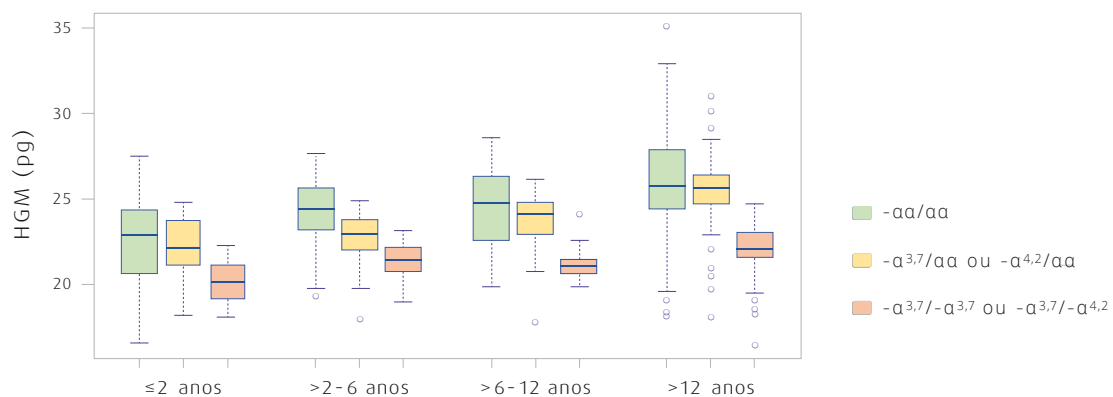
Genótipo	aa/aa			$-\alpha^{3,7}/aa$ e $-\alpha^{4,2}/aa$			$-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ e $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{4,2}$			$-\text{SEA}/aa$			$-\text{SEA}/-\alpha^{3,7}$		Significância estatística			
	n	\bar{x}	2S	n	\bar{x}	2S	n	\bar{x}	2S	n	\bar{x}	2S	n	\bar{x}	p_a	p_b	p_c	p_d
Hemoglobina (g/dL)																		
≤ 2 anos (n=92)	42	10,8	2,5	25	11,1	2,4	25	10,8	1,4						0,39	0,22	0,79	
>2-6 anos (n=58)	20	12,1	2,5	25	11,9	3,0	13	10,6	1,3						0,62	<0,01	<0,001	
>6-12 anos (n=60)	19	12,1	3,0	23	12,4	2,3	16	11,1	1,3	2	12,2	2,3			0,46	<0,001	<0,05	0,06
>12 anos F (n=169)	69	11,8	2,6	43	11,9	2,3	53	11,0	2,4	5	11,3	1,4			0,47	<0,01	<0,001	0,56
>12 anos M (n=117)	40	12,9	3,8	37	13,5	3,7	38	12,9	3,2				1	11,0	0,23	0,14	0,84	
VGM (fL)																		
≤ 2 anos (n=92)	42	71,0	12,1	25	69,5	8,8	25	64,3	6,8						0,29	0,91	<0,001	
>2-6 anos (n=58)	20	73,8	11,7	25	71,0	8,7	13	69,2	7,1						0,07	0,19	<0,05	
>6-12 anos (n=60)	19	75,7	14,1	23	73,3	9,7	16	68,0	7,9	2	65,8	8,1			0,28	<0,001	<0,001	0,45
>12 anos F (n=169)	69	79,6	13,8	43	79,3	11,6	53	71,0	8,6	5	69,0	2,9			0,83	<0,01	<0,001	0,40
>12 anos M (n=117)	40	81,8	15,6	37	79,6	9,9	38	71,8	7,3				1	67,4	0,14	<0,001	<0,001	
HGM (pg)																		
≤ 2 anos (n=92)	42	22,4	5,0	25	22,1	3,6	25	20,2	2,3						0,70	<0,001	<0,001	
>2-6 anos (n=58)	20	24,1	4,4	25	22,8	3,4	13	21,4	2,3						<0,05	<0,05	<0,001	
>6-12 anos (n=60)	19	24,4	5,1	23	23,7	4,1	16	21,1	2,1	2	20,8	2,7			0,32	<0,001	<0,001	0,54
>12 anos F (n=169)	69	25,7	5,6	43	25,3	4,6	53	22,0	2,8	5	22,0	0,5			0,50	<0,01	<0,001	0,93
>12 anos M (n=117)	40	26,7	6,7	37	25,7	3,7	38	22,3	2,3				1	18,3	0,10	<0,001	<0,001	

Para o grupo etário >12 anos, os géneros foram considerados separadamente.

p_a representa valor de p entre aa/aa e $-\alpha^{3,7}/aa$; p_b representa valor de p entre $-\alpha^{3,7}/aa$ e $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$;

p_c representa valor de p entre aa/aa e $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$; p_d representa valor de p entre $-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$ e $-\text{SEA}/aa$.

Figura 2: Valores de HGM (hemoglobina globular média) dos diferentes genótipos de α -talassémia deletional, nos quatro grupos etários.





Estes resultados evidenciam que o VGM e o HGM são excelentes índices para a seleção dos testes moleculares a utilizar na identificação do genótipo. Quanto maior o número de genes alfa deletados, menores os valores de VGM e HGM. Tal como descrito previamente, o parâmetro mais fortemente correlacionado com o número de genes alfa deletados é o HGM. Encontra-se descrito que um valor de HGM < 21,9 pg é preditivo da presença de deleção α^0 (6). Os resultados (tabela 2) estão concordantes com o descrito e reforçam que o valor de *cut-off* do HGM de 25 pg, utilizado no laboratório da Unidade de Diagnóstico Laboratorial e Referência, tem sensibilidade adequada para discriminar a presença de uma deleção α^0 -talassémia.

A doença de Hb H apresentava uma anemia microcítica/hipocrômica (Hb=11g/dL; VGM=67,4fL; HGM=18,3pg) e um valor de Hb A₂ particularmente baixo (HbA₂ =1,3%). O alelo α^0 corresponde a uma deleção --^{SEA} originária do Sudeste asiático. A doença por Hb H encontra-se normalmente associada a uma redução significativa de cadeias α globina, e conseqüentemente a um excesso de cadeias β globina que levam a formação do tetrâmero β^4 (Hb H). A instabilidade da Hb H leva à presença de anemia hemolítica crónica, com microcitose e hipocromia, redução da Hb A₂ e níveis de Hb F ligeiramente aumentados (1-3%) (4).

Os casais com os genótipos $-\alpha^+/aa$ e $-\alpha^+/-\alpha^+$ podem transmitir à sua descendência um ou mais genes α^+ , no entanto não existe o risco de *Hydrops fetalis* (Hb Bart's) ou Hb H.

Por outro lado, a presença de uma deleção α^0 assume particular importância na prevenção da ocorrência de Hb Bart's na descendência de um casal em que ambos são portadores, e no seu aconselhamento genético.

Conclusão

O diagnóstico de α -talassémia deletional só pode ser efetuado por métodos moleculares, no entanto os parâmetros hematológicos são marcadores preditivos importantes do número de genes alfa deletados e na avaliação da relação genótipo/fenótipo.

Referências bibliográficas:

- (1) Beutler E, Lichtman MA, Colker BS, et al. (eds.). Williams Hematology. 5th ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division, cop. 1995.
- (2) Direção-Geral da Saúde. Circular Normativa N.º 18/DSMIA, 7/9/2004. Prevenção das formas graves de Hemoglobinopatia. <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/circular-normativa-n-18dsmia-de-07092004-pdf.aspx>
- (3) Ryan K, Bain BJ, Worthington D, et al.; British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. Br J Haematol. 2010 Apr;149(1):35-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08054.x>
- (4) Bain BJ (ed.). Haemoglobinopathy diagnosis. 3rd. Wiley-Blackwell, 2020.
- (5) NHS Sickle Cell and Thalassaemia Screening Programme: Handbook for antenatal laboratories. 4th ed., September 2017
- (6) Velasco-Rodríguez D, Blas C, Alonso-Domínguez JM, et al. Cut-Off Values of Hematologic Parameters to Predict the Number of Alpha Genes Deleted in Subjects with Deletional Alpha Thalassemia. Int J Mol Sci. 2017 Dec 13;18(12):2707. <https://doi.org/10.3390/ijms18122707>